

08.12.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

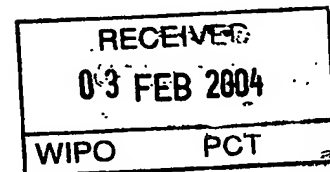
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    1 月 1 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 0 0 5 1 5 0  
Application Number:

[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 0 0 5 1 5 0 ]

出      願      人                      鐘 淵 化 学 工 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

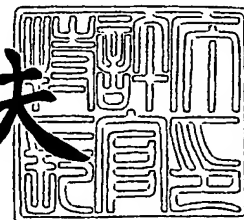


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年    1 月 1 6 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4945

【提出日】 平成15年 1月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 41/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 上田 真

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 難波 弘憲

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

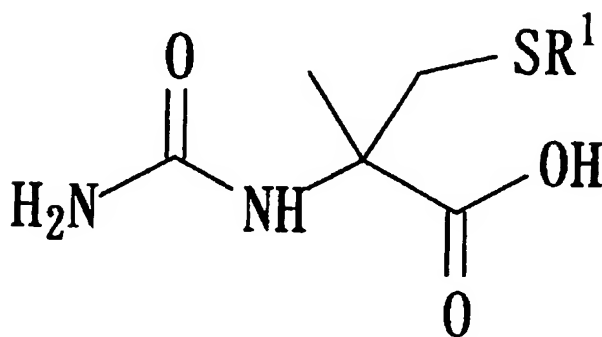
【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造方法

【特許請求の範囲】

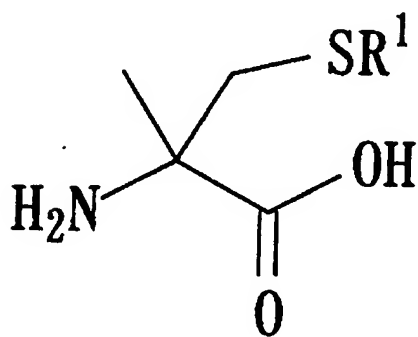
【請求項 1】 一般式 (1) ;

【化 1】



(式中、 $R^1$ は置換基を有していても良い炭素数 1 から 20 のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数 7 から 20 のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 6 から 20 のアリール基を表す) で表されるラセミ体または光学活性体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを用させて加水分解することを特徴とする一般式 (2) ;

【化 2】



(式中、 $R^1$ は前記と同じ) で表されるラセミ体又は光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造方法。

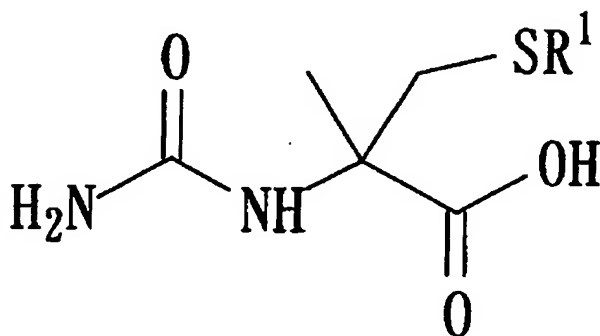
【請求項 2】 N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) 及び得られる  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) が光学活性体である請求項 1 記載の製造

方法。

【請求項 3】 N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) 及び得られる  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) が L 体である請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

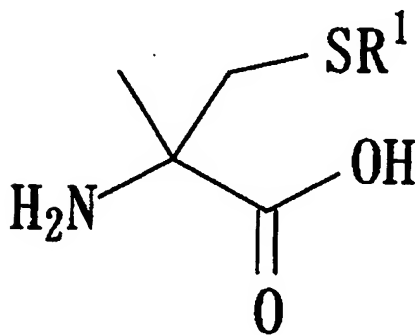
【請求項 4】 一般式 (1)

【化 3】



(式中、 $R^1$ は置換基を有していても良い炭素数 1 から 20 のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数 7 から 20 のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 6 から 20 のアリール基を表す) で表されるラセミ体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させて立体選択的に加水分解することを特徴とする、一般式 (2)

【化 4】



(式中、 $R^1$ は前記と同じ) で表される光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体及び当該化合物とは逆の立体配置を有する光学活性 N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造方法。

【請求項5】得られる光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(2)がL体である請求項4記載の製造方法。

【請求項6】デカルバミラーゼが、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、又はシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物由来である請求項1から5のいずれか記載の製造方法。

【請求項7】デカルバミラーゼが、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、リゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) KNK1415 (FERM BP-4419)、又はシュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 由来である請求項1から5のいずれか記載の製造方法。

【請求項8】デカルバミラーゼが、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pNT4553) (FERM BP-4368) 由来である請求項1から5のいずれか記載の製造方法。

【請求項9】デカルバミラーゼを固定化酵素として使用することを特徴とする請求項1から8のいずれか記載の製造方法。

【請求項10】 $R^1$ が置換基を有していても良い炭素数4から15の3級アルキル基である請求項1から9のいずれか記載の製造方法。

【請求項11】 $R^1$ が $t$ -ブチル基である請求項1から9のいずれか記載の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬品等の中間体として有用な、 $\alpha$ 位に2つの異なる置換基を有するアミノ酸の1種である  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造法に関する。より詳細には、ラセミ体あるいは光学活性N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させることにより光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体および光学活性N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体、とりわけL

—  $\alpha$ —メチルシステイン誘導体を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

光学活性  $\alpha$ —メチルシステイン誘導体の製造法としては、次の様な方法が知られている。

- 1) 光学活性システインとピバルアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉メチル化による方法（特許文献1～3）。
- 2) 光学活性アラニンとベンズアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉チオメチル化による方法（非特許文献1）。
- 3) システインとシアノベンゼンより得られるチアゾリン化合物のメチル化を行い、得られたラセミ体のチアゾリン化合物をキラルHPLCにて分離精製する方法（非特許文献2）。
- 4) 光学活性バリンとアラニンより合成される光学活性ジケトピペラジン化合物を不斉プロモメチル化し、得られた化合物の臭素原子をアルカリ金属アルキルチオラートで置換する方法（非特許文献3）。
- 5) 2—メチル—2—プロペン—1—オールのシャープレス不斉酸化により得られる光学活性な2—メチルグリシドールから光学活性アジリジンを合成し、これにチオールを反応させる方法（非特許文献4）。
- 6) アミノマロン酸誘導体をメチル化した後に、豚肝臓エステラーゼ（以下PLEと略す）による非対称化を行い、得られた非対称エステルをチオ酢酸アルカリ金属塩と反応させる方法（非特許文献5）。

【0003】

また、N—カルバミル— $\alpha$ —メチルシステイン誘導体に酵素を作用させることにより加水分解を行い、ラセミ体もしくは光学活性体の  $\alpha$ —メチルシステイン誘導体を得る方法はこれまで知られていない。

【0004】

【特許文献1】

特表 2000-515166

【0005】

## 【特許文献2】

WO 01/72702

【0006】

## 【特許文献3】

WO 01/72703

【0007】

## 【非特許文献1】

Tetrahedron、1999年、55巻、10685頁

【0008】

## 【非特許文献2】

Synlett、1994年、9巻、702頁

【0009】

## 【非特許文献3】

J. Org. Chem.、1992年、57巻、5568頁

【0010】

## 【非特許文献4】

J. Org. Chem.、1995年、60巻、790頁

【0011】

## 【非特許文献5】

J. Am. Chem. Soc.、1993年、115巻、8449頁

【0012】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記1)～4)の方法はいずれも、ブチルリチウム等の高価な塩基を用いた低温反応が必要である。5)の方法では、工程数が長くて煩雑であり高価な試薬を多く使う必要がある。6)の方法ではエステラーゼとしてPLEを用いたジエステルの非対称化をキーとしているが、PLEは大量生産が困難であるため工業的規模での安定確保は難しく、実用的とはいえない。このように、いずれの方法においても光学活性 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の工業的製造法としては解決すべき課題を有している。

## 【0013】

一方、本発明者らは上記課題を解決する手段として、ラセミ体のN-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にヒダントイナーゼを作用させてD体選択的に環化させることにより、N-カルバミル- $\alpha$ -メチル-L-システイン誘導体及びD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体を得、さらに得られたN-カルバミル- $\alpha$ -メチル-L-システイン誘導体を化学的に加水分解することにより $\alpha$ -メチル-L-システイン誘導体を得る方法を見出した（特願2002-164598）。しかしながら、この方法はN-カルバミル- $\alpha$ -メチル-L-システイン誘導体を加水分解する工程において多量の酸又はアルカリを必要とし、また反応時間が長く、更に改良の余地があった。

## 【0014】

従って本発明の目的は、医薬品の中間体として有用な光学活性 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を安価で入手容易な原料からより簡便に製造でき、工業的生産に対して実用的な方法を提供することにある。

## 【0015】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らはかかる課題を解決するため、鋭意検討を行った結果、ラセミ体又は光学活性N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させることにより加水分解させ、ラセミ体又は光学活性体の $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を得る方法、及びラセミ体のN-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させることにより立体選択的に加水分解させ、光学活性体の $\alpha$ -メチルシステイン誘導体及び光学活性体のN-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を得る方法を見出し、本発明を完成するに至った。

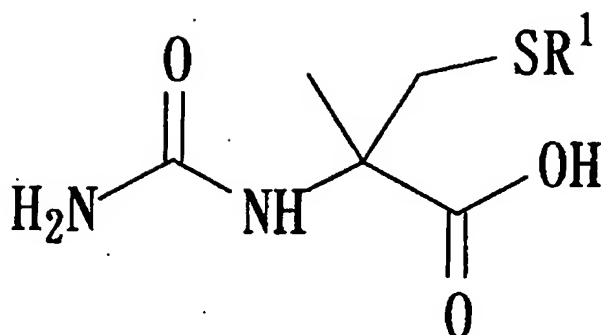
## 【0016】

すなわち本発明は、一般式（1）；

## 【0017】



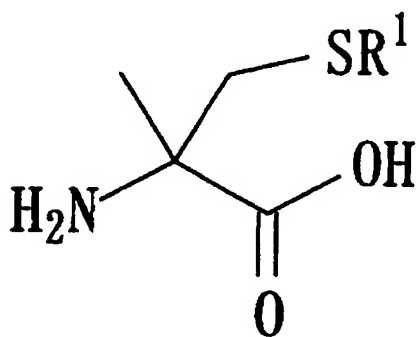
【化5】



(式中、R<sup>1</sup>は置換基を有していても良い炭素数1から20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7から20のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数6から20のアリール基を表す) で表されるラセミ体又は光学活性体のN-カルバミルーα-メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させ加水分解することを特徴とする、一般式(2)；

【0018】

【化6】



(式中、R<sup>1</sup>は前記と同じ) で表されるラセミ体又は光学活性体のα-メチルシステイン誘導体の製造方法に関する。

【0019】

また本発明は、上記式(1)で表されるラセミ体のN-カルバミルーα-メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させ立体選択的に加水分解することを特徴とする上記式(2)で表される光学活性α-メチルシステイン誘導体および当該化合物とは逆の立体配置を有する光学活性N-カルバミルーα-メチルシ

ステイン誘導体の製造方法に関する。

### 【0020】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

### 【0021】

本発明に用いるN-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(1)において、 $R^1$ は置換基を有していても良い炭素数1から20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7から20のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数6から20のアリール基を表す。

### 【0022】

炭素数1から20のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基等の直鎖アルキル基もしくはイソプロピル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、ネオペンチル基、*t*-ペンチル基等の分枝アルキル基が挙げられる。炭素数7から20のアラルキル基としては、例えばベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基等が挙げられる。また、炭素数6から20のアリール基としては、例えばフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

### 【0023】

上記アルキル基、アラルキル基、又はアリール基は無置換であってもよく、また置換基を有していてもよい。置換基としては、アミノ基、ヒドロキシル基、フェニル基、アリール基、アルカノイル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシル基、ハロゲン原子等が挙げられる。

### 【0024】

上記の中でも、脱保護の容易さの点から、 $R^1$ としては置換基を有していても良い炭素数4から15の3級アルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数7から20のアラルキル基が好ましい。具体的には、*t*-ブチル基、*t*-ペンチル基、*t*-ヘキシル基、ベンジル基等が挙げられ、さらに好ましくは*t*-ブチル基である。

### 【0025】

前記式(1)で表されるラセミ体N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導

体は、例えば Bucherer 法によりチオアセトンヒダントインに誘導した後、これを加水分解することにより  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体とし (Agr. Biol. Chem., 1971, 35, 53-58, Bull. Korean Chem. Soc., 1988, 9, 231-235, Tetrahedron Asymmetry, 1997, 2913-2920)、次いでシアン酸カリウムで処理することにより取得することができる。

#### 【0026】

また、前記式 (1) で表される光学活性体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体は、例えばラセミ体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にヒダントイナーゼ (例えば、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) IFO 12996 由来のヒダントイナーゼ等) を作用させて D 体選択的に環化させ、生成した N-カルバミル- $\alpha$ -メチル-L-システイン誘導体と D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体を、晶析などによって分離することにより取得することができる。

#### 【0027】

次にラセミ体又は光学活性体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) をデカルバミラーゼによって加水分解し、ラセミ体又は光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) を製造する方法、及びラセミ体の N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) をデカルバミラーゼによって立体選択的に加水分解し、光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) を製造する方法について説明する。

#### 【0028】

ここでデカルバミラーゼとは、N-カルバミル- $\alpha$ -アミノ酸誘導体を加水分解して  $\alpha$ -アミノ酸誘導体を生成する活性を有する酵素を表す。

#### 【0029】

本発明で用いるデカルバミラーゼとしては、N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) を加水分解できるものであれば、動物、植物、又は微生物由来のいずれでも使用できるが、工業的な利用には、入手若しくは調製の容易さの点から微生物由来のものが好ましい。

## 【0030】

酵素源となる微生物としては、当該酵素の生産能力を有する微生物であればいずれも利用できる。例えば公知のものとして、特公昭57-18793号、特公昭63-20520号、特公平1-48758号および特開平6-233690号に開示されたアクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アエロバクター (*Aerobacter*) 属、アエロモナス (*Aeromonas*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ブラストバクター (*Blastobacter*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、モラキセラ (*Moraxella*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、又はスポロサルシナ (*Sporosarcina*) 属に属する微生物などが挙げられる。

## 【0031】

好ましくは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、ブラストバクター (*Blastobacter*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、又はリゾビウム (*Rhizobium*) 属に属する微生物由来の酵素が挙げられる。

## 【0032】

さらに好ましくは、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、リゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) KNK1415 (FERM BP-4419)、又はシュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 由来の酵素が挙げられる。

## 【0033】

上記微生物は野生株であってもよく、また、変異処理によってデカルバミラーゼ活性が高められた変異株であってもよい。さらに、遺伝子組換え等の方法を用いて、上記微生物由来のデカルバミラーゼを高生産するように作成された形質転換微生物であってもよい。

#### 【0034】

なお、アグロバクテリウム・スピーシーズ KNK712 (FERM BP-1900) 株は昭和63年5月31日に、リゾビウム・スピーシーズ KNK1415株 (FERM BP-4419) は平成5年9月22日に、シュードモナス・スピーシーズ KNK003A (FERM BP-3181) 株は平成2年12月1日に、それぞれ上記の寄託番号にて、独立行政法人産業技術総合研究所・特許微生物寄託センターに寄託されている。

#### 【0035】

また、デカルバミラーゼを効率良く高生産する形質転換微生物は、例えばWO92/10579記載のように、デカルバミラーゼ活性を示す菌株からデカルバミラーゼ遺伝子をクローニングした後、適当なベクターとの組換えプラスミドを作成して、これを用いて適当な宿主菌を形質転換することで得られる。なお、組換えDNA技術については当該分野において周知であり、例えば、Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) に記載されている。

#### 【0036】

このようにして得られた、デカルバミラーゼを高生産する形質転換微生物としては、WO92/10579記載のアグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900) 由来のデカルバミラーゼ遺伝子を含むエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109 (pAD108) (FERM BP-3184)、シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK0

03A (FERM BP-3181) 由来のデカルバミラーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109 (pPD304) (FERM BP-3183) およびWO94/03613記載の遺伝子改変により耐熱性の向上したアグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900) 由来のデカルバミラーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pNT4553) (FERM BP-4368)などを挙げるができる。

#### 【0037】

なお、エシェリヒア・コリ JM109 (pAD108) (FERM BP-3184) 株及びエシェリヒア・コリ JM109 (pPD304) (FERM BP-3183) 株は平成2年12月1日に、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pNT4553) (FERM BP-4368) 株は平成5年7月22日に、それぞれ上記の寄託番号にて、独立行政法人産業技術総合研究所 特許微生物寄託センターに寄託されている。

#### 【0038】

デカルバミラーゼの生産は、前述のデカルバミラーゼ活性を示す微生物、或いは形質転換微生物を通常の方法で培養することにより行い得る。培養は、通常液体栄養培地で行われるが、固体表面培養によっても行うことができる。培地には通常資化し得る炭素源、窒素源、各種微生物の生育に必須の無機塩栄養素を含有させる。更にp-ヒドロキシフェニルグリシン、フェニルグリシン等のアミノ酸；N-カルバミルメチオニン、N-カルバミルフェニルアラニンなどのN-カルバミル- $\alpha$ -アミノ酸；5-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン、5-フェニルヒダントイン等の5置換ヒダントイン類；ウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$ -ウレイドプロピオン酸等のピリミジン代謝物；尿素； $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Be^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cs^{+}$ 等の金属イオン類を少量添加してデカルバミラーゼの生産を増強することが好ましい。これらデカルバミラーゼ生産増強物質の培地中濃度は、金属イオン類で0.1mM以上、10mM以下、その他の物質で0.01重量%以上、1重量%以下の範囲から選ばれる。

## 【0039】

培養は通常、温度として20℃以上、85℃以下の範囲、好ましくは25℃以上、60℃以下の範囲、pHとしては4以上、11以下の範囲、好ましくはpH 5以上、9以下の範囲が用いられ、通気攪拌によって微生物の生育を促進することもできる。

## 【0040】

本発明において、前述の微生物によって生産されたデカルバミラーゼは、酵素自体として用いることができるほか、本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物としても用いることができる。ここで、微生物の処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、またはそれらの菌体の破砕物を意味する。

## 【0041】

更にそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化して得た固定化酵素として用いられ得る。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、物理的吸着法、包括法などで行い得る。なお、酵素を固定化して安定化することで、酵素反応を、より過酷な温度域で行うことなどが可能となり、反応をより効率的に進行させることができる。さらに、酵素の反復使用が可能となること、製造プロセスが簡略化できるなどによる製造コストの低減等のメリットも期待できる。

## 【0042】

本発明の酵素反応は以下の方法で行うことができる。基質として前記式(1)で表されるラセミ体又は光学活性体のN-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を用い、前述のデカルバミラーゼ存在下、水性媒体中で反応を行う。基質の仕込み濃度は0.1% (w/v) 以上、90% (w/v) 以下、好ましくは1% (w/v) 以上、60% (w/v) 以下で溶解または懸濁した状態で反応を行い、反応温度は10℃以上、80℃以下、好ましくは20℃以上、60℃以下の適当な温度で調節し、pH 4以上、9以下、好ましくはpH 5以上、8以下に保ちつつ暫時静置または攪拌すればよい。また、基質を連続的に添加しうる。反応は、バッチ法または連続方式で行い得る。本発明の反応は、固定化酵素、膜リアク

ターなどを利用して行うことも可能である。

#### 【0043】

水性媒体としては、水、緩衝液、これらにエタノールのような水溶性有機溶媒を含む水性媒体、あるいは、水に溶解しにくい有機溶媒、たとえば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、*n*-ヘキサンなどの有機溶媒を含む水性媒体との2層系などの適当な溶媒を用いることができる。さらに必用に応じて、抗酸化剤、界面活性剤、補酵素、金属などを添加することもできる。

#### 【0044】

かくして、ラセミ体又は光学活性体のN-カルバミルー $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(1)は加水分解され、ラセミ体又は光学活性体の $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(2)に変換される。また、本酵素反応が立体選択的に進行する場合には、ラセミ体のN-カルバミルー $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(1)から光学活性 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(2)とその逆の立体配置を有する光学活性N-カルバミルー $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(1)が生成する。

#### 【0045】

酵素の入手の容易さや反応効率の観点からは、L体の化合物(1)を加水分解するか、若しくは、ラセミ体の化合物(1)をL体選択的に加水分解することにより、L体の $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(2)を製造するのが好ましく、基質の調製の容易さからは、ラセミ体の化合物(1)をL体選択的に加水分解するのがより好ましい。

#### 【0046】

立体選択的な加水分解を行う場合、L体選択的なデカルバミラーゼとしては、アグロバクテリウム・スピーシーズ KNK712 (FERM BP-1900)、リゾビウム・スピーシーズ KNK1415 (FERM BP-4419)、又はシュードモナス・スピーシーズ KNK003A (FERM BP-3181)由来の酵素が好ましく、これら微生物若しくはその処理物を好適に用いることができる。また、前述のごとく、上記微生物由来のデカルバミラーゼを生産するように改変されたエシェリヒア・コリ JM109 (pAD108) (FERM BP-3184)、エシェリヒア・コリ JM109 (pPD304) (



FERM BP-3183) 又はエシェリヒア・コリHB101 (pNT4553) (FERM BP-4368) 等の形質転換微生物若しくはその処理物も好適に使用でき、エシェリヒア・コリHB101 (pNT4553) (FERM BP-4368) の菌体若しくはその処理物がより好ましい。

#### 【0047】

生成したラセミ体又は光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) とラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) は、通常の分離方法、例えば抽出、濃縮、晶析、またはカラムクロマトグラフィーなどの分離方法やそれらの組み合わせにより分離、精製することができるが、以下の方法によりより容易に行うことができる。

#### 【0048】

ラセミ体又は光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) の水に対する溶解度が中性付近の pH 域では極めて低いのに対し、ラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) は水に対して比較的良好な溶解度を有する。したがって酵素反応終了後に反応液 pH を中性付近に調整することにより、ラセミ体又は光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (2) の結晶が析出し、ろ過によりラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) と容易に分離することができる。このときの pH としては 4 以上、10 以下が好ましく、より好ましくは 6 以上、8 以下である。

#### 【0049】

また、上記処理後に得られたラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) を含むろ液は、pH を酸性にすることでラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体 (1) の結晶が析出し、ろ過により容易に分離することができる。用いる酸としては特に制限されるものではないが、酢酸、硝酸、硫酸、塩酸等が挙げられ、価格、取り扱いの容易さから塩酸が好ましい。pH は 1 以上、5 以下の範囲が好ましく、あまり低いと化学的に環化してヒダントインとなってしまうため、特に好ましくは 2 以上、4 以下の範囲である。

#### 【0050】

さらに、得られた光学活性N-カルバミル- $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(1)は、化学的に、若しくは脱カルバミル活性を有する酵素を用いてカルバミル基を除去することにより、容易に、上記 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体とは逆の立体配置を有する光学活性 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体(2)に導くことができる。

#### 【0051】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【0052】

##### 【実施例】

(参考例1) ラセミ体5-メチル-5- $\alpha$ -ブチルチオメチルヒダントインの製法

窒素風船を備えた反応容器に、5wt%水酸化ナトリウム水溶液9.6g、 $\alpha$ -ブチルメルカプタン1.13mlを0℃で混合し、10分間攪拌した。クロロアセトン0.79mlを加え、室温に昇温し2時間反応させた。このとき反応溶液は淡黄色で二相分離していた。反応容器にジムロート型冷却管を備え、シアン化ナトリウム588mg、炭酸水素アンモニウム2.77g、30wt%アンモニア水3.1mlを加え、均一な溶液とした後、55-60℃に昇温した。6時間加熱攪拌した後、0℃に冷却し、反応溶液に濃塩酸を加えpH7.0-7.6に調整した。生成した白色結晶1.84gを濾別した(収率84.8%)。<sup>1</sup>H-NMR分析により目的物であることを確認した。

#### 【0053】

(参考例2) ラセミ体N-カルバミル-S- $\alpha$ -ブチル- $\alpha$ -メチルシステインの製法

ラセミ体5-メチル-5- $\alpha$ -チオメチルヒダントイン4.77gを10wt%水酸化ナトリウム水溶液75gに溶解し、72時間還流させた。室温まで放冷後反応液を一部抜き取り、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用した分析にてラセミ体S- $\alpha$ -ブチル- $\alpha$ -メチルシステインの生成を確認した。濃塩酸にてpHを8に調整した後、溶液を70℃に加熱、シアン酸カリウム2.07g

を蒸留水 10 ml に溶解した溶液を 20 分かけて滴下した。滴下終了後、5 時間攪拌した後、反応液の一部を抜き取り HPLC にて分析したところ未反応のアミノ酸が認められたので、さらにシアン酸カリウム 4.14 g を蒸留水 20 ml に溶かした溶液を 20 分かけて滴下した。滴下終了後、さらに 1 時間攪拌し室温まで放冷、濃塩酸にて pH を 2 とし、析出した固体をろ取した。得られた固体を水洗、乾燥させた後、<sup>1</sup>H-NMR で分析し、目的物であることを確認した (3.38 g、収率 66%)。

HPLC 分析条件;

使用カラム: COSMOSIL 5C18-ARI (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm、ナカライテスク社製)、移動相: 10 mM リン酸/リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 97/3、カラム温度: 40  $^{\circ}$ C、測定波長: 210 nm、流速: 1.0 ml/分。

#### 【0054】

(実施例 1) アグロバクテリウム属細菌を用いた S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチル-L-システインの製造

アグロバクテリウム・スピーシーズ KNK712 (FERM BP-1900) を試験管内で滅菌した 10 ml の培地 A (ポリペプトン 10 g、肉エキス 10 g、イーストエキス 5 g、グリセリン 5 g、リン酸二水素カリウム 5 g、リン酸水素二ナトリウム 5 g、水 1 l、滅菌前 pH 6.5) に接種し、30  $^{\circ}$ C で 24 時間振とう培養した。この培養液 1 ml を、坂口フラスコ内で滅菌した 100 ml の培地 B (グリセリン 25 g、シュクロース 5 g、イーストエキス 4 g、リン酸二水素カリウム 5 g、リン酸水素二ナトリウム 5 g、リン酸マグネシウム七水和物 1 g、塩化マンガン四水和物 0.01 g、水 1 l、滅菌前 pH 6.5) に接種し、更にろ過滅菌した尿素 0.2 g、N-カルバミル-D-p-ヒドロキシフェニルグリシン 0.2 g を添加して、33  $^{\circ}$ C にて 36 時間振とう培養した。得られた培養液 16.5 ml から遠心分離により得られた菌体を 0.2 M N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) / 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 1.5 ml に懸濁し、ラセミ体の N-カルバミル-S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチルシステイン 75 mg と 75% システアミ

ン水溶液 0.2  $\mu$ l を加え、更に 10 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH 6.5 に調整し、窒素雰囲気下、40℃で 25 時間攪拌した。途中、6 N 塩酸の添加により pH を 6.5 付近に保った。反応終了後、生成物を HPLC を用いて分析した結果、S-トープチル- $\alpha$ -メチルシステインが変換率 10.0%、光学純度 33.7% ee で生成していた。また、得られた S-トープチル- $\alpha$ -メチルシステインが L 体であることを、別途合成した標品との HPLC 分析による保持時間の比較により確認した。

HPLC 分析条件 (変換率測定) ;

使用カラム: COSMOSIL 5C18-ARII (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm、ナカライテスク社製)、移動相: 10 mM リン酸/リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 8/2、カラム温度: 40℃、測定波長: 210 nm、流速: 1.0 ml/分。

HPLC 分析条件 (S-トープチル- $\alpha$ -メチルシステイン光学純度測定) ;

使用カラム: SUMICHIRAL OA-5000 (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm、住化分析センター社製)、移動相: 2 mM 硫酸銅水溶液/アセトニトリル = 85/15、カラム温度: 23℃、測定波長: 254 nm、流速: 1.5 ml/分。

### 【0055】

(実施例 2) リゾビウム属細菌を用いた S-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システインの製造

実施例 1 と同様の方法により培養したリゾビウム・スピーシーズ KNK1415 (FERM BP-4419) の培養液 36 ml から遠心分離により得られた菌体を 0.2 M HEPES/水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 1.5 ml に懸濁し、ラセミ体の N-カルバミル-S-トープチル- $\alpha$ -メチルシステイン 75 mg と 75% システアミン水溶液 0.2  $\mu$ l を加え、更に 10 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH 6.5 に調整し、窒素雰囲気下、40℃で 25 時間攪拌した。途中、6 N 塩酸の添加により pH を 6.5 付近に保った。反応終了後、生成物を実施例 1 と同様にして分析した結果、S-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システインが変換率 9.5%、光学純度 2.4% ee で生成していた。

## 【0056】

(実施例3) シュードモナス属細菌を用いたS-トープチルー $\alpha$ -メチルーL-システインの製造

シュードモナス・スピーシーズ KNK003A (FERM BP-3181) を試験管内で滅菌した10mlの培地C (トリプトン16g、イーストエキス10g、塩化ナトリウム5g、水1l、滅菌前pH7) に接種し、45℃で27時間振とう培養した。この培養液1mlを、坂口フラスコ内で滅菌した100mlの培地D (グリセリン10g、イーストエキス0.03g、リン酸二水素カリウム3.5g、リン酸水素二ナトリウム3.5g、リン酸マグネシウム七水和物0.5g、塩化マンガン四水和物0.02g、硫酸第一鉄七水和物0.01g、炭酸カルシウム1g、水1l、滅菌前pH7) に接種し、更に別途滅菌したグルコース0.5g、ろ過滅菌したN-カルバミルー D-アラニン0.2gを添加して、45℃で61時間振とう培養した。得られた培養液30mlから遠心分離により得られた菌体を0.2M HEPES/水酸化ナトリウム緩衝液 (pH6.5) 1.5mlに懸濁し、ラセミ体のN-カルバミルーS-トープチルー $\alpha$ -メチルシステイン75mgと75%システアミン水溶液0.2 $\mu$ lを加え、更に10N水酸化ナトリウム水溶液によりpH6.5に調整し、窒素雰囲気下、40℃で20時間攪拌した。途中、6N塩酸の添加によりpHを6.5付近に保った。反応終了後、生成物を実施例1と同様にして分析した結果、S-トープチルー $\alpha$ -メチルーL-システインが変換率4.2%、光学純度11.7% eeで生成していた。

## 【0057】

(実施例4) 形質転換微生物エシェリヒア・コリ HB101 (pNT4553) を用いたS-トープチルー $\alpha$ -メチルーL-システインの製造

遺伝子改変により耐熱性の向上したアグロバクテリウム・スピーシーズ KNK712 (FERM BP-1900) 由来のデカルバミラーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ HB101 (pNT4553) (FERM BP-4368) を試験管内で滅菌した10mlの培地C (トリプトン16g、イーストエキス10g、塩化ナトリウム5g、水1l、滅菌前pH7) に接種し、更に別途

ろ過滅菌したアンピシリンナトリウム塩1mgを添加して、37℃で12時間振とう培養した。この培養液3.5mlを、坂口フラスコ内で滅菌した350mlの培地Cに接種し、更に別途ろ過滅菌したアンピシリンナトリウム塩35mgを添加して、37℃で30時間振とう培養した。得られた培養液3.6mlから遠心分離により得られた菌体を0.2M HEPES/水酸化ナトリウム緩衝液(pH6.5)1.5mlに懸濁し、ラセミ体のN-カルバミル-S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチルシステイン75mgと75%システアミン水溶液0.2 $\mu$ lを加え、更に10N水酸化ナトリウム水溶液によりpH6.5に調整し、窒素雰囲気下、40℃で20時間攪拌した。途中、6N塩酸の添加によりpHを6.5付近に保った。反応終了後、生成物をHPLCを用いて分析した結果、S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチル-L-システインが変換率4.2%、光学純度11.7% eeで、N-カルバミル-S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチルシステインが変換率61.8%、光学純度6.1% eeで生成していた。また、得られたN-カルバミル-S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチルシステインがD体であることを、別途合成した標品とのHPLC分析による保持時間の比較により確認した。

HPLC分析条件(N-カルバミル-S-tert-ブチル- $\alpha$ -メチルシステイン光学純度測定) ;

使用カラム: CHIRALPAK AS (4.6mm $\phi$ ×250mm、ダイセル化学社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール/トリフルオロ酢酸=85/15/0.1、カラム温度: 30℃、測定波長: 210nm、流速: 0.5ml/分。

### 【0058】

(実施例5) 固定化デカルバミラーゼを用いたS-tert-ブチル- $\alpha$ -メチル-L-システインの製造

WO94/03613記載の培養方法に従い、エシェリヒア・コリ HB101 pNT4553 (FERM BP-4368) を培養、集菌後、WO92/22643記載の固定化酵素の調製方法に従い超音波破碎して得た酵素液に固定化担体である陰イオン交換樹脂、Duolite A-568を添加して酵素を吸着させ、さらにグルタルアルデヒドで架橋処理することで固定化デカルバミ

ラーゼを得た。次にラセミ体N-カルバミル-S-トープチル- $\alpha$ -メチルシステイン75mgに0.2M HEPES/水酸化ナトリウム緩衝液(pH6.5)1.5mlと75%システアミン水溶液0.2 $\mu$ lを加え、更に10N水酸化ナトリウム水溶液によりpH6.5に調整した。この溶液に、上記固定化デカルバミラーゼ75mg(湿重量)を加えて、窒素雰囲気下、40℃で27時間攪拌した。途中、6N塩酸の添加によりpHを6.5付近に保った。反応終了後、生成物を実施例1および4と同様の方法により分析したところ、S-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システインが変換率64.6%、光学純度29.1%eeで、N-カルバミル-S-トープチル- $\alpha$ -メチル-D-システインが変換率35.4%、光学純度21.1%eeで生成していた。

#### 【0059】

(実施例6) 形質転換微生物エシェリヒア・コリ HB101 (pNT4553)を用いたS-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システインの製造

実施例4と同様の方法により培養したエシェリヒア・コリ HB101 (pNT4553) (FERM BP-4368)の培養液60mlから遠心分離により得られた菌体を1mMシステアミン水溶液10mlに懸濁し、N-カルバミル-S-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システイン(光学純度99.6%ee)500mgを加え、更に10N水酸化ナトリウム水溶液によりpH6.5に調整し、窒素雰囲気下、40℃で25時間攪拌した。途中、2wt%硫酸の添加によりpHを6.5付近に保った。反応終了後、生成物を実施例4と同様の方法により分析した結果、S-トープチル- $\alpha$ -メチル-L-システインが変換率98.7%で生成していた。

#### 【0060】

##### 【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、安価で入手容易な原料から簡便かつ工業的に実施可能な方法によって、医薬品等の中間体として有用な光学活性 $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医薬品等の中間体として有用な光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体を、安価で入手容易な原料から、簡便かつ工業的に製造する方法を提供すること。

【解決手段】 ラセミ体又は光学活性体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させて加水分解することによるラセミ体または光学活性体の  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造方法、及びラセミ体の N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体にデカルバミラーゼを作用させて立体選択的に加水分解することによる光学活性  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体及び当該化合物とは逆の立体配置を有する光学活性 N-カルバミルー  $\alpha$ -メチルシステイン誘導体の製造方法。

【選択図】 なし。



特願 2003-005150

出願人履歴情報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社